

BA

Full  
Text

AN 1996-253890 [26] WPIDS

DNN N1996-213392 DNC C1996-080384

TI Evaluating antifungal agent quantitatively - comprises implanting fungi causing disease in skin, admin. of antifungal agent, cultivating and measuring scale of formed colony..

DC B04 C07 D16 S03

PA (POKK) POLA CHEM IND INC

CYC 1

PI JP--08103291 A 19960423 (199626)\* 4p

ADT JP--08103291 A 1994JP-0239983 19941004

PRAI 1994JP-0239983 19941004

AN 1996-253890 [26] WPIDS

AB JP 08103291 A UPAB: 19960705

Evaluating an antifungal agent comprises implanting fungi causing disease in skin and administering antifungal agent, followed by cultivation, and measuring the scale of the colony formed.

ADVANTAGE - Quantitative evaluation of antifungal agent can be effected.

Dwg. 0/0

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-103291

(43) 公開日 平成8年(1996)4月23日

(51) Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12Q 1/06		6807-4B		
G01N 33/15	B			

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全4頁)

(21) 出願番号 特願平6-239983

(22) 出願日 平成6年(1994)10月4日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年8月31日、  
日本医真菌学会発行の「第38回日本医真菌学会総会プロ  
グラム・抄録集」に発表

(71) 出願人 000113470

ポーラ化成工業株式会社  
静岡県静岡市弥生町6番48号

(72) 発明者 馬島 敏郎

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ  
化成工業株式会社戸塚研究所内

(72) 発明者 内田 勝久

東京都練馬区中村3-16-3

(72) 発明者 山口 英世

神奈川県川崎市多摩区栗谷2-15-5

(74) 代理人 弁理士 有賀 三幸 (外3名)

(54) 【発明の名称】 抗真菌剤の評価法

(57) 【要約】

【構成】 動物の皮膚に表在性真菌症原因菌を移植した  
後又は当該移植前に被検体を投与し、しかる後に皮膚よ  
り採取した小断片を培養し、当該培地上に生育したコロ  
ニーの大きさを測定して皮膚内の真菌を定量する抗真菌  
剤の評価法。

【効果】 抗真菌作用の定量的比較、貯留性の比較が可  
能なので、抗真菌剤の開発に大変有益である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物の皮膚に表在性真菌症原因菌を移植した後、被検体を投与し、しかる後に皮膚より採取した小断片を培養し、当該培地上に生育したコロニーの大きさを測定して皮膚内の真菌を定量することを特徴とする抗真菌剤の評価法。

【請求項2】 動物に被検体を投与した後、表在性真菌症原因菌を動物の皮膚に移植し、しかる後に皮膚より採取した小断片を培養し、当該培地上に生育したコロニーの大きさを測定して皮膚内の真菌を定量することを特徴とする抗真菌剤の評価法。

【請求項3】 皮膚内の真菌の定量が、測定したコロニーの大きさを、別個に作成された検量線と対比して行うものである請求項1又は2記載の評価法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗真菌剤の評価法に関し、更に詳しくは、皮膚内の真菌数を正確に定量することによる正確な抗真菌剤の評価法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】本邦に於ける表在性真菌症患者は1200から1800万人と試算されている。患者が多い原因は生活環境、生活形態、生活習慣に起因すると考えられる真菌の伝播力の強さと、繰り返し感染蔓延する根治の困難さ等が考えられる。これは、有効な薬剤の開発が遅々としているためであり、その原因はかかる真菌の生育が皮膚内であるため、薬効発現に薬物動態が複雑に絡み、なおかつ皮膚内に於ける真菌の適切な定量方法がなかった為である。皮膚内の真菌の定量が正確にできないために適切な薬物の評価ができなかったのである。

【0003】従来、皮膚内の真菌の定量は皮膚を採取して裁断し、複数の小断片を取り出し、これを培地中に植え、これより真菌の生えてきた断片の数を計数し、全断片数で除した値を指標として用いていた。しかしながら、この方法では数値が1を断片数で除した値の倍数にしかならず、従って不連続であり、更に、少量しか生えてこない断片も、多量に生えた断片も同じ扱いになってしまうので、この方法では、皮膚片に於ける真菌の有無は判定できても、正しい定量はできなかった。したがって、抗真菌剤の評価も偶然性によって揺れることが多く、たまたま真菌の存在していない部位を採取すると優れた抗真菌作用を有すると誤認されることも少なくなかった。更に、実際には既存薬より優れた抗真菌作用を有している抗真菌剤でも有意差なしと判断されて上市にいたらなかった可能性があったことも否めない。更に、抗真菌剤の各種のイン・ビトロの評価法も考案されているが、強固な生体の防壁である、皮膚内に生息する真菌に対する抗真菌作用の評価方法としてイン・ビトロの評価法が適していないことは言うまでもない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は的確な抗真菌剤の評価が行える評価法を提供することを目的とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】上記実状を踏まえ、本発明者らは的確な抗真菌作用の評価は的確な皮膚内の真菌の定量に依存すると考え、かかる手段を求め鋭意研究を重ねた結果、皮膚中に存在する真菌数と真菌を有する皮膚を培地中で培養して得られたコロニーの大きさの間に極めて良好な相関関係があることを見いだして発明を完成させた。

【0006】すなわち、本発明は、動物の皮膚に表在性真菌症原因菌を移植した後、被検体を投与し、しかる後に皮膚より採取した小断片を培養し、当該培地上に生育したコロニーの大きさを測定して皮膚内の真菌を定量することを特徴とする抗真菌剤の評価法を提供するものである。また、本発明は、動物に被検体を投与した後、表在性真菌症原因菌を移植し、しかる後に皮膚より採取した小断片を培養し、当該培地上に生育したコロニーの大きさを測定して皮膚内の真菌を定量することを特徴とする抗真菌剤の評価法を提供するものである。

【0007】本発明において、抗真菌剤という語は、

1) 抗真菌作用を有する化合物、2) 1) の化合物を含む組成物の両者を意味し、組成物には人為的な組成物である剤形と天然抽出物などの人為的でない組成物とが含まれる。

【0008】ここで、本発明の抗真菌作用の評価法の対象となる真菌は、表在性真菌症原因菌であるが、これを具体的に例示するならば、トリコフィトン属 (*Trichophyton*)、ミクロスポーラム属 (*Microsporum*)、エピデルモフィトン属 (*Epidermophyton*) 等の不完全糸状菌やキャンディダ属 (*Candida*)、マラセチア属 (*Malassezia*) の不完全酵母、及びこれらの変異株が挙げられる。このような変異株としては、自然に薬物に対して耐性を獲得した耐性株、栄養依存性を有するようになった栄養依存性変異株、遺伝子導入などを行い人為的に変異させた人工変異株等が例示できる。

【0009】本発明方法に用いられる動物としては、哺乳類、例えばラット、モルモット、ウサギ、マウス、ブタ等が挙げられる。これらの動物の皮膚への真菌の移植方法としては、真菌を皮膚上に塗布する方法、真皮を露出させて当該真皮上に塗布する方法、クローズドパッチ法、皮内注射法等が挙げられるが、再現性の点よりクローズドパッチ法が好ましい。

【0010】被検体の投与は、被検体の種類によって異なり、経皮投与、経口投与、静脈内投与等が挙げられるが、経皮投与が好ましい。

【0011】本発明方法において、真菌の移植と被検体の投与とは、いずれを先に行ってもよい。真菌の移植後に被検体の投与を行えば、抗真菌剤の治療効果が評価で

きる。一方、被検体の投与を行った後真菌を移植する場合、抗真菌剤の感染予防作用あるいは抗真菌剤の皮膚貯留性が評価できる。抗真菌剤の皮膚貯留性を評価する場合には、被検体投与後、真菌移植までの期間を変化させるのが好ましい。

【0012】皮膚より小断片を採取するには、必要に応じて除毛した後、適当な大きさの皮膚を切り出した後1断片あたり $1 \times 1 \sim 20 \times 20 \text{ mm}$ に切断すればよい。この小断片は、真菌以外の細菌を除去する目的で塩化ベンザルコニウム、ヒピテングルコネート等の殺菌剤溶液で洗淨するのが好ましい。

【0013】得られた小断片の培養に用いる培地としては、通常培養や菌分離等に用いているものであれば特に限定はなく、例えば、サブロー培地、改変サブロー培地、ツァベック寒天培地等が例示できる。

【0014】培養は、 $10 \sim 40^\circ\text{C}$ 、好ましくは $20 \sim 40^\circ\text{C}$ でコロニーが生育するのに十分な時間、例えば1～20日間静置培養すればよい。

【0015】培養後、培地上に生育したコロニーの大きさを測定する。コロニーの大きさの測定は、長径(1)及び短径(s)を計測し、その積(1×s)を求めて、コントロールと対比するのが簡便で好ましい。

【0016】真菌数の定量は、コロニーの大きさを、別個に作成された検量線と対比して行うことができる。この検量線はコロニーの大きさと真菌数との間の相関性を示す検量線であり、例えば所定の菌数の真菌を前記と同一の条件で培養し、生育したコロニーの大きさを測定することにより作成できる。ここで菌数の計測法としては、菌体全体をニュートラルレッドの様な染色剤で染色し、その着色度により菌数を計量しても良いし、同位体などでマークした栄養素の代謝を放射活性より定量して菌数を測定しても良い。最も好適な菌数の計数方法は、菌体と分生子を分離し、血球計数板等で分生子を計数しこれを菌数のコントロールとすることである。この方法によれば、極めて簡易に再現性良く菌数のコントロールを作ることができる。ここで用いるコントロール真菌は、標準株でも臨床分離株でも良い。

【0017】また、皮膚からの小断片の採取を経時的に2度以上行い、それぞれの皮膚内の真菌数を定量すれば、作用の持続性等の抗真菌剤投与後の動態特性を評価することができる。更に、本発明において被検体として、組成物を用いた場合には、その組成物としての評価(例えば、基剤の評価、剤形の評価など)ができる。

【0018】

【実施例】以下に実施例を挙げて更に詳しく本発明について説明するが、本発明がこれら実施例に何等限定されないことは言うまでもない。

【0019】実施例1

皮膚内真菌の測定例

(1) コントロール系列の作成

トリコフィトンTIMM1189株(Trichophyton mentagrophytes TIMM189)を改変サブロー寒天スラントに接種し、 $27^\circ\text{C}$ で21日培養した。培養後、スラントに滅菌した磷酸緩衝液(0.1重量%の界面活性剤( Tween 80)を含む)を加え、スラント表面を白金耳で擦り取った。次に菌液は滅菌ガーゼを通し菌糸を除き分生子を得た。分生子は血球計算盤でカウントし $2 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$ に調製した。この後、同じ磷酸緩衝液を用いて菌液の10倍希釈液列を作成した。(分生子希釈液はサブロー寒天シャーレに $100 \mu\text{l}$ づつ播種し $27^\circ\text{C}$ で培養し、3日目、5日目、7日目にそれぞれ生菌数を算定した。)この操作と平行してサブロー寒天平板を作成した。本サブロー寒天にはシクロヘキシミド $100 \mu\text{g/ml}$ 、シソマイシン $50 \mu\text{g/ml}$ 、クロラムフェニコール $100 \mu\text{g/ml}$ を溶かし込んで作成した。これら抗生物質は細菌の生育をさせない一方、真菌の生育には支障の無い条件で設定したが、これら以外の抗生物質の組合せでサブロー寒天平板を作成しても構わない。次に、サブロー寒天に滅菌したスパーテル等で幅2mm、長さ10mmのミゾを彫った(彫った溝の寒天は平板から除いた)。この溝に分生子希釈液をそれぞれ $10 \mu\text{l}$ 入れ、 $27^\circ\text{C}$ で5日間培養し生育コロニーを測定し長径(1)と短径(s)をノギスで計測した。これら1とsを掛け合わせた値A値を片対数グラフの正数座標に、その溝に播種した生菌数を対数座標にプロットした。この作業について、4回接種菌数を変え繰り返した。このうち2回は同一接種菌数で行った。これらの結果を図1～3に示す。これらは何れも直線上にプロットされており、非常に相関性が良いことが明白である。更に再現性も良好であることが分かる。

【0020】(2) モルモット皮膚内の真菌数の定量  
ハートレー系5週令雌モルモットの背部左右2カ所を電気バリカンで除毛後、ガムテープを用いストリッピングして真皮を露出させた。次に、トリコフィトンTIMM1189株(Trichophyton mentagrophytes TIMM189)由来分生子を $1 \times 10^6 \text{ cfu}$ モルモット背部皮膚露出部分(直径2cmの円形状)に接種した。菌接種13日目及び20日目にモルモットを屠殺し患部皮膚を直径2cmの円形状に切り取り、1%殺菌剤で洗淨後、滅菌水ですすぎ表面の雑菌を除き、摘出皮膚はハサミで10等分した。この皮膚切片は上の項で述べた別のサブロー寒天平板に埋め込み $27^\circ\text{C}$ で培養した。培養5日目にモルモット5匹左右10カ所の菌生育域を上項で述べた方法で、全ての切片につきA値を算出した。これを1部位毎10切片平均値を算出後、他の部位との平均値(Avg±SD)を求めた。モルモットに菌接種13日の菌生育域は1切片あたり平均 $1.764 \pm 0.231$ 、20日のそれは $0.846 \pm 0.763$ であった。同時に培養したコントロールとのA値の比較より、1切片当たりの菌数は $450 \text{ cfu}$ と算出された。

## 【0021】実施例2

## ケラチンの影響の確認

皮膚内の真菌の定量を行うに当たって考慮すべきことは、皮膚の構成蛋白であるケラチンが菌の定量に悪影響を与えるか否かである。そこで、実施例1の(1)の作業について、ケラチンのあり、なしでの相関性を検討した。結果を表1に示す。これより、本発明の定量法はケラチンの有無に関わらず、植えた分生子の数と生成したコロニーの大きさの間に極めて良い相関関係を有している。従って、本発明の定量法は皮膚構成蛋白に影響され

## 【0022】

【表1】

分生子数	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	相関係数
ケラチンあり	3.6	2.5	1.7	0.6	0.1	0	0.97
ケラチンなし	4	2.2	1.6	0.7	0.1	0	0.96

## 【0023】実施例3

## 剤形による抗真菌作用の違いの評価

上記の手法に則り、抗真菌作用の知られている化合物である、ビフォナゾールの剤形による抗真菌作用の違いの評価を行った。用いた2つの剤形は親水軟膏をベヒクルとしたものとエタノール溶液をベヒクルにしたものであった。薬物投与は感染5日後から1週間0.3g/日投与した。治療後2日に屠殺し皮膚を取り出した。動物実験での従来法、即ち、コロニーを生じた皮膚片の出現率を見る方法では、表2に示した結果の如く、剤形による効果の差はもとより、抗真菌剤の抗真菌作用すら見いだせなかった。一方、本発明の評価方法によれば、剤形の差による抗真菌作用は表3に示すが如く、親水軟膏ベースの剤形の方が優れている事が明らかに判る。更に、ビフォナゾールの抗真菌作用も *in vivo* で明確に確認できる。従って、本発明の評価方法が実状を良く反映し、的確に評価できる事が明らかである。

## 【0024】

【表2】

検 体	菌陽性率(%)
無処置	100
ビフォナゾール-親水軟膏	96
親水軟膏	100
ビフォナゾール-エタノール	99
エタノール	100

## 【0025】

【表3】

検 体	平均菌数(cfu)
無処置	200
ビフォナゾール-親水軟膏	2
親水軟膏	100
ビフォナゾール-エタノール	5
エタノール	120

## 【0026】実施例4

## 分画中の抗真菌成分のスクリーニング例

抗真菌作用があることで知られている微生物代謝物の分画A(ブタノール分画)と分画B(水分画)について抗真菌作用を調べた。分画Aは4%濃度で、分画Bは2%と4%の濃度で実施例3と同様の処置をした。本評価方法による結果を表4に示す。抗真菌作用を有する物質はA分画に多く含有されている事が如実に判る。尚、従来の評価方法では何れも100%の菌陽性率を示し、分画方法をの是非や抗真菌物質の存在を知る事が出来なかった。これより、本発明の評価方法が優れている事が明白である。

## 【0027】

【表4】

検 体	平均菌数(cfu)
ベヒクル	200
分画A	30
分画B 4%	60
分画B 2%	200

## 【0028】

【発明の効果】本発明の評価法によれば、抗真菌作用の定量的比較、貯留性の比較が可能なので、抗真菌剤の開発に大変有益である。